

Krzysztof Wanic^{1, 2}, Maciej Małecki¹, Tomasz Klupa¹, Paweł Wołkow², Jacek Bocheński², Jan Skupień¹, Joanna Bobrek¹, Jacek Sieradzki¹

¹Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

²Sekcja Genetyki i Epidemiologii, Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston, MA, Stany Zjednoczone

Rola wybranych polimorfizmów w genach kandydatach związanych z insulinoopornością w patogenezie cukrzycy typu 2

Badanie w populacji polskiej

The role of insulin resistance candidate gene polymorphisms in susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population

STRESZCZENIE

WSTĘP. W cukrzycy typu 2 współistnieją upośledzenie wydzielania insuliny i zmniejszona wrażliwość na jej działanie. Celem badania było poszukiwanie związku polimorfizmów w genach kandydatach insulinooporności (–308 G→A w promotorze genu TNF- α (*tumor necrosis factor α*) oraz wariantu aminokwasowego K121Q w genie PC-1) z cukrzycą typu 2 w populacji polskiej oraz przeanalizowanie wpływu powyższych polimorfizmów na przedcukrzycowe cechy ilościowe.

MATERIAŁ I METODY. Przebadano 732 osoby. Do analizy związku wybranych markerów z cukrzycą typu 2 włączono 612 niespokrewnionych osób (*case-control analysis*): 358 chorych na cukrzycę i 254 osoby z grupy kontrolnej. W analizie przedcukrzycowych cech ilościowych przebadano 120 osób z prawidłowymi stężeniami glukozy (średni wiek: 34,2 roku, średni BMI: 27,9), z dodatnim wywiadem rodzinnym

w kierunku cukrzycy typu 2. W grupie tej dokonano pomiaru stężeń insuliny i glukozy podczas doustnego testu tolerancji glukozy (OGTT, *oral glucose tolerance test*) oraz obliczono pośrednie wskaźniki wrażliwości na insulinę. U wszystkich badanych osób przeprowadzono genotypowanie metodą zmiennej długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*). W analizie statystycznej w badaniu osób niespokrewnionych użyto testu χ^2 . W części projektu, związanej z cechami ilościowymi, zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z uwzględnieniem wpływu płci, wieku i wskaźnika masy ciała (BMI, *body mass index*). **WYNIKI.** Stwierdzono zbliżony rozkład alleli u chorych na cukrzycę typu 2 i u osób z grupy kontrolnej: 15,7%/84,2% vs. 14,0%/86,0%, $p = 0,38$ dla polimorfizmu –308 G→A TNF- α i 12,9%/87,1% vs. 13,1%/86,9%, $p = 0,86$ dla wariantu aminokwasowego K121Q genu PC-1. Podobnie nie zaobserwowano różnic w rozkładzie genotypów. Jednak przy analizie cech ilościowych nosiciele przynajmniej jednego allelu A w genie TNF- α (28% analizowanych osób) cechowali się wyższym wskaźnikiem obliczonym jako stosunek stężenia insuliny w 120. minucie do stężenia insuliny na czczo niż nosiciele genotypu GG ($5,9 \pm 6,5$ vs. $3,4 \pm 2,4$; $p = 0,04$). Ponadto, pewne dodatkowe różnice wykazano w analizie stratyfikacyjnej, przeprowadzonej na podstawie BMI, płci i wieku chorych w odniesieniu do obu badanych polimorfizmów.

Adres do korespondencji: Prof. dr hab. Jacek Sieradzki

Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

ul. Kopernika 15, 31–501 Kraków

e-mail: mmsierad@cyf-kr.edu.pl

Diabetologia Praktyczna 2004, tom 5, 2, 75–83

Copyright © 2004 Via Medica

Nadesłano: 2.03.2004 Przyjęto do druku: 6.04.2004

Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Collegium Medicum UJ (Grant 501/KL/439/L) oraz NIH (Grant FIRCA 1 R03 TW01351–01).

WNIOSKI. Oba badane markery, –308 G→A promotora genu TNF- α oraz wariant aminokwasowy K121Q PC-1, wydają się wpływać na przedcukrzycowe cechy ilościowe w populacji polskiej. Nie znaleziono natomiast dowodów ich związku z cukrzycą typu 2 w badanej populacji.

Słowa kluczowe: insulinowrażliwość, przedcukrzycowe cechy ilościowe, genetyka, cukrzyca typu 2

ABSTRACT

INTRODUCTION. Insulin secretion impairment and decreased insulin sensitivity coexist in type 2 diabetes mellitus. Aim of the study was: 1) to search for the association of insulin resistance candidate gene markers, the TNF- α –308 G/A promoter polymorphism and the K121Q PC-1 variant, with type 2 diabetes in a Polish population; 2) to examine their influence on pre-diabetes quantitative traits.

MATERIALS AND METHODS. Overall 732 subjects were examined. For case-control analysis we included 612 individuals: 358 type 2 diabetes patients and 254 controls. To assess prediabetic quantitative traits we examined 120 normoglycaemic individuals (the mean age: 34.2 years, the mean BMI: 27.9) with a family history of type 2 diabetes. The insulin and glucose levels were measured during OGTT and secondary indices were calculated. The groups were genotyped using RFLP. For the case-control study χ^2 test was used. For quantitative traits a multivariate linear regression analysis was employed.

RESULTS. The allele distribution was similar in the group of patients and in the controls: (15.7%/84.2% vs. 14.0%/86.0%, $p = 0.38$, for the — 308 G/A TNF- α polymorphism, and 12.9%/87.1% vs. 13.1%/86.9%, $p = 0.86$, for K121Q PC-1 variant, respectively). Similarly, there was no difference in the genotype distribution. However, the carriers of at least one TNF1- α A allele (28% of the analyzed subjects) showed a higher ratio of 120-min insulin to the fasting insulin versus GG carriers (5.9 ± 6.5 vs. 3.4 ± 2.4 ; $p = 0.04$). Moreover, some additional differences were found for both markers in stratified analyses based on BMI, gender and age at examination.

CONCLUSION. Both examined markers, the TNF- α –308 G→A promoter polymorphism and the K121Q PC-1 variant, seem to influence the prediabetic quantitative traits in a Polish population. However, in case-control study we did not find the evidence of their association with type 2 diabetes in a Polish population.

Key words: insulin sensitivity, pre-diabetes quantitative traits, genetics, type 2 diabetes mellitus

Wstęp

Prawdopodobnie najistotniejszym problemem współczesnej diabetologii i jednym z najważniejszych wyzwań medycyny na początku XXI wieku jest epidemia cukrzycy typu 2. Ocenia się, że liczba chorych na cukrzycę na świecie osiągnęła 200 milionów [1, 2]. Zdecydowaną większość przypadków stanowi cukrzyca typu 2. W społeczeństwach uprzemysłowionych chorobowość z powodu tych schorzeń osiągnęła kilka procent całej populacji i ciągle rośnie [1, 2]. Przez kilkadziesiąt lat cukrzyca typu 2, zwana wcześniej insulinoniezależną, była uważana zarówno przez lekarzy, jak i przez chorych za mniej groźną postać tej choroby. Dzisiaj jednak naukowcy, lekarze, pacjenci, politycy i całe społeczeństwa uświadamiają sobie, że jest ona najczęstszą przyczyną przedwczesnej umieralności, głównie z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego oraz powikłań, prowadzących czasem do utraty wzroku, amputacji kończyn i niewydolności nerek. W związku z diagnozą cukrzycy typu 2 oczekiwana długość życia milionów ludzi ulega skróceniu [3]. Choroba ta obciąża psychicznie i ekonomicznie pacjentów, ich rodziny, lokalne społeczności, systemy opieki zdrowotnej i całe społeczeństwa [4]. Cukrzyca typu 2 charakteryzuje się dwoma głównymi defektami patofizjologicznymi: upośledzonym wydzielaniem insuliny i jej zmniejszonym obwodowym działaniem [5]. Obydwa mają swoje korzenie w interakcji czynników genetycznych i środowiskowych [5–7].

W ostatniej dekadzie nastąpił znaczący postęp w metodyce genetycznej, co pozwoliło na identyfikację różnic w sekwencji, które są odpowiedzialne za powstawanie niektórych przypadków choroby. Do chwili obecnej około 10 genów powiązано z rozwojem monogenowej formy cukrzycy typu 2, na przykład autosomalnej dominującej (MODY, *maturity onset diabetes of the young*) lub dziedzicznej w linii żeńskiej [8–10]. Formy te są stosunkowo rzadkie i dotyczą kilku procent wszystkich przypadków cukrzycy typu 2. Charakteryzują się one wysoką penetracją i ciężkim upośledzeniem wydzielania insuliny [8, 10].

Mniejsze sukcesy odniesiono w zakresie identyfikacji genów predysponujących do powstawania powszechnych, poligenowych, złożonych form choroby. Ta postać cukrzycy z reguły rozwija się u osób w średnim lub w podeszłym wieku i wiąże się zarówno z upośledzonym wydzielaniem insuliny, jak i z insulinopornością. Jej obraz kliniczny powstaje w wyniku wzajemnej interakcji czynników środowiskowych i genetycznych, takich jak częste polimorfizmy wielu genów, nie zaś tylko jednego. Te polimorfizmy są zlokalizowane w częściach kodujących lub

regulatorowych i występują, choć z różną częstością, także w zdrowej populacji [11]. Różnice sekwencji dwóch genów — kalpainy 10 i PPAR γ — powiązano do tej pory w sposób jednoznaczny ze złożoną formą cukrzycy typu 2 [12, 13]. Polimorfizmy w tych genach wpływają przede wszystkim na insulinowrażliwość u ludzi [14, 15]. Ponadto istnieją dowody, że wiele innych genów, takich jak: adiponektyna [16], receptor 1 pochodnych sulfonilomocznika (SUR 1, *sulphonylurea receptor*) [17], gen HFE dziedzicznej hemochromatozy [18] i insuliny [19], może także zwiększać podatność na tę chorobę, działając poprzez różne mechanizmy. Obecnie trwają badania, które mają zweryfikować hipotezę, że częste polimorfizmy w genach MODY wpływają na rozwój powszechnych form cukrzycy typu 2 [20–23].

Potencjalnie bardzo interesująca wydaje się też rola naturalnych inhibitorów działania insuliny, takich jak czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*) oraz PC-1 (*the human plasma-cell membrane differentiation antigen 1*).

Inhibitor TNF- α jest produktem tkanki tłuszczowej, antagonistą insuliny na poziomie postreceptorowym [24]. W obrębie promotora jego genu znajduje się polimorfizm –308 G \rightarrow A, który wydaje się wpływać na ekspresję tego białka [25]. Można przypuszczać, że zwiększona transkrypcja i translacja genu TNF- α przyczynia się do rozwoju insulinoooporności [26, 27].

Produkt białkowy genu PC-1 po modyfikacjach posttranslacyjnych jako glikoproteina hamuje aktywność kinazy tyrozynowej receptora insulinowego poprzez interakcję z jego podjednostką α [28, 29]. Potencjalnie więc warianty aminokwasowe w zakresie tego genu, które mają większą siłę inhibicji, mogą zwiększać insulinoooporność. To zaś może się przyczyniać do powstania cukrzycy typu 2. Dostępne są dane dotyczące niektórych populacji, sugerujące, że do rozwoju insulinoooporności przyczynia się wariant aminokwasowy, w którym lizyna zostaje zastąpiona przez glutaminę (K121Q) w obrębie egzonu 4 genu PC-1 [30, 31]. W świetle powyższych faktów można postawić hipotezę o możliwym wpływie obu polimorfizmów na rozwój przedcukrzycowych cech ilościowych oraz samej cukrzycy typu 2 w różnych populacjach i grupach etnicznych, w tym w populacji polskiej.

Cele badania autorów były następujące: 1) poszukiwanie związku polimorfizmu –308 G \rightarrow A w promotorze genu TNF- α oraz wariantu aminokwasowego K121Q w genie PC-1 z cukrzycą typu 2 w populacji polskiej; 2) badanie wpływu powyższych polimorfizmów na przedcukrzycowe cechy ilościowe.

Materiał i metody

Badana populacja

W części badania dotyczącej poszukiwania związku alleli i genotypów wybranych polimorfizmów (*case-control study*) z cukrzycą typu 2 uczestniczyło 612 osób: 358 chorych na cukrzycę typu 2 oraz 254 osoby z grupy kontrolnej. Rekrutację przeprowadzono zgodnie z wcześniejszym opisem [32, 33], według aktualnych kryteriów i definicji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) [34]. Pacjenci otrzymali standardowe ankiety, które zawierały pytania dotyczące wieku, w którym rozpoznano u nich cukrzycę typu 2, wywiadu rodzinnego, aktualnego leczenia oraz innych kwestii medycznych. Do badania włączono jedynie chorych z diagnozą kliniczną cukrzycy typu 2, którzy przez co najmniej 2 lata po jej rozpoznaniu nie byli leczeni insuliną. Osoby te poddano podstawowemu badaniu fizykalnemu, obejmującemu między innymi ocenę wzrostu, masy ciała i ciśnienia tętniczego. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano osoby z prawidłową glikemią na czczo oraz ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku cukrzycy typu 2 wśród krewnych pierwszego stopnia. W skład tej grupy wchodziło głównie małżonkowie chorych na cukrzycę typu 2 oraz ochotnicy spośród personelu medycznego. Trzecią podgrupę badaną w ramach opisywanego projektu stanowiło 120 dorosłych osób, które poddano analizie pod kątem przedcukrzycowych cech ilościowych. Charakteryzowali się oni prawidłową tolerancją glukozy oraz dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku cukrzycy typu 2, dotyczącym jednego z rodziców. U tych 120 osób oznaczano stężenie glukozy i insuliny w surowicy w trakcie doustnego testu tolerancji glukozy (OGTT, *oral glucose tolerance test*) (na czczo, w 30. i 120. minucie OGTT), co pozwoliło obliczyć pośrednie współczynniki sekrecji insuliny oraz insulinoooporności. Oceniano następujące ilościowe cechy przedcukrzycowe: stężenie insuliny i glukozy na czczo oraz w 30. i 120. minucie po doustnym obciążeniu 75 g glukozy, co pozwoliło także obliczyć dynamiczne współczynniki relacji insulinemii i glikemii w trakcie testu, wskaźniki sekrecji insuliny (*insulin secretion indices*) [19, 21, 24, 36, 37] oraz dokonać oceny insulinoooporności metodą HOMA (*homeostatic model assessment*) [24, 35].

Wszyscy włączeni do badania byli rasy kaukaskiej i pochodzili z południowo-wschodniej Polski. Badanie przeprowadzono zgodnie z Deklaracją Helsińską po zaakceptowaniu przez Komisję Bioetyczną *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Genotypowanie

Za pomocą odczynnika DNAzol (Gibco) z limfocytów krwi obwodowej wyizolowano DNA badanych osób. Genotypowanie badanej grupy w zakresie wybranych polimorfizmów (–308 G→A w promotorze TNF- α oraz K121Q w PC-1) wykonano, wykorzystując metodę zmiennej długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*). Odpowiednie fragmenty genów, zawierające opisywane polimorfizmy, namnożono za pomocą reakcji PCR wykonanych z użyciem DNA badanych osób. Do reakcji PCR użyto uprzednio opisywane primery [25, 38]. Produkty PCR trawiono enzymem restrykcyjnym (odpowiednio: Nco I i Ava II), a następnie poddano elektroforezie na 3-procentowym żelu agarozowym. Wynik genotypowania odczytano zgodnie z uprzednimi opisami [25, 29, 38–40]. Sporządzono dokumentację fotograficzną otrzymanych wyników, którą zapisano w wersji cyfrowej w komputerowej bazie danych, korzystając z oprogramowania Biocapt (Vilbert-Lourmant, Marne LaValle, Francja).

Statystyka

Różnice w dystrybucji alleli i genotypów analizowano przy zastosowaniu nieparametrycznego testu istotności χ^2 . Potencjalne odchylenia od stanu równowagi Hardy-Weinberga oceniano za pomocą testu χ^2 .

Aby określić istotność różnic w odniesieniu do cech ilościowych, zaprojektowano model analizy wieloczynnikowej ANOVA (moduł *GENERAL LINEAR MODEL*), gdzie zmienną grupującą była obecność poszczególnych par alleli. Ze względu na niewielką liczebność rzadszych homozygot obu polimorfizmów utworzono 4 podgrupy porównywane w parach — po 2 dla każdego z badanych polimorfizmów: odpowiednio GG oraz łącznie AA i AG dla polimorfizmu –308 G→A w promotorze TNF- α i KK oraz łącznie

QQ i KQ dla wariantu aminokwasowego K121Q w PC-1. Współczynnik istotności różnic oznaczono jako p.

Zarówno dla cech ilościowych, jak i jakościowych przeprowadzono analizę podgrup stratyfikowanych względem płci, wieku i BMI.

Wyniki

W sumie allele i genotypy zdefiniowano u 732 osób: u 612 dla potrzeb analizy związku z cukrzycą typu 2 w badaniu osób niespokrewnionych (*case-control study*) oraz u 120 osób badanych pod kątem cech ilościowych. Charakterystykę wszystkich trzech badanych grup przedstawiono w tabeli 1. W każdej z grup osobno oraz w całej badanej populacji pozostawały w równowadze Hardy-Weinberga. Rozkład alleli i genotypów u chorych na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej nie różnił się (tab. 2). Poza analizami przedstawionymi w tabeli przeprowadzono dodatkowe porównania w podgrupach pacjentów, aby zweryfikować hipotezę, że badane polimorfizmy mogą się wiązać z cukrzycą typu 2. Chorych na cukrzycę podzielono na podstawie BMI (powyżej i poniżej wartości średniej dla całej grupy, tj. 31), wieku zachorowania (powyżej i poniżej wartości średniej dla całej grupy, tj. 50 lat) oraz wywiadu rodzinnego w kierunku cukrzycy typu 2 (dodatni vs. ujemny). Także te dodatkowe analizy nie wykazały znamiennych statystycznie różnic.

Wyniki analiz cech ilościowych u 120 osób z dodatnim wywiadem rodzinnym i prawidłową tolerancją glukozy, u których występują polimorfizmy –308 promotora genu TNF- α oraz wariantu K121Q genu PC-1 przedstawiono w tabelach 3 i 4. W tabeli 3 porównano współczynniki sekrecji insuliny oraz insulinooporności wśród nosicieli allelu A (homozygot AA i heterozygot AG) w pozycji –308 promotora genu TNF- α oraz homozygot GG. Liczebność przedstawionych poniżej podgrup przedstawiała się następująco: 34 osoby to nosiciele allelu A, 86 osób — homo-

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna badanych grup

Cecha	Chorzy na cukrzycę typu 2	Grupa kontrolna	Grupa do badania cech ilościowych
Kobiety/Mężczyźni	192/166	154/100	74/46
Wiek przy badaniu (lata)	59,6 ± 9,4	51,6 ± 15,2	38,85 ± 13,3
Wiek diagnozy (lata)	50,0 ± 9,3		
Czas trwania choroby (lata)	9,7 ± 7,6		
BMI [kg/m ²]	31,0 ± 5,8	28,4 ± 6,5	27,92 ± 7,8
Osoby leczone insuliną	51,9%		

Wartości wyrażone są jako średnie ± SD. Wysoki odsetek osób leczonych insuliną wśród chorych na cukrzycę typu 2 należy wiązać ze stosunkowo długim okresem trwania choroby

Tabela 2. Rozkład alleli i genotypów badanych polimorfizmów u chorych na cukrzycę typu 2 oraz w grupie kontrolnej

	Allele			Genotyp			
Gen TNF- α							
Polimorfizm –308 G/A	A	G	$\chi^2 = 0,75$	AA	AG	GG	$\chi^2 = 1,9$
Cukrzyca typu 2	113 (15,7%)	603 (84,2%)	1.d.f	10 (2,8%)	93 (26,0%)	255 (71,2%)	2.d.f
Grupa kontrolna	71 (14,0%)	437 (86,0%)	p = 0,38	3 (1,2%)	65 (25,6%)	186 (73,2%)	p = 0,39
Gen PC-1	K	Q		KK	KQ	QQ	
Wariant K121Q			$\chi^2 = 0,03$				$\chi^2 = 0,04$
Cukrzyca typu 2	92 (12,8%)	624 (87,2%)	1.d.f	8 (2,2%)	74 (20,8%)	273 (76,9%)	2.d.f
Grupa kontrolna	67 (13,3%)	441 (86,7%)	p = 0,86	6 (2,3%)	55 (21,7%)	193 (76,0%)	p = 0,97

d.f (degree of freedom) — stopień swobody

Tabela 3. Współczynniki sekrecji insuliny oraz insulinoooporności/insulinowrażliwości (stężenia glukozy podano w mmol/l, a stężenia insuliny w μ j./ml) wśród nosicieli allelu A w pozycji –308 promotora genu TNF- α oraz homozygot GG

	Nosiciele allelu A	Homozygoty GG	p
Insulina 0 min OGTT*	11,26 \pm 15,37	11,37 \pm 9,37	> 0,05
Insulina 30 min OGTT	75,2 \pm 33,74	61,92 \pm 36,24	> 0,05
Insulina 120 min OGTT	41,29 \pm 41,09	32,24 \pm 27,89	> 0,05
Glukoza 0 min OGTT	4,66 \pm 0,64	4,43 \pm 0,76	> 0,05
Glukoza 30 min OGTT	7,22 \pm 1,97	6,99 \pm 1,8	> 0,05
Glukoza 120 min OGTT	5,24 \pm 1,4	4,92 \pm 1,32	> 0,05
Insulina 0 min/glukoza 0 min OGTT	2,37 \pm 2,94	2,57 \pm 2,01	> 0,05
Insulina 120 min/insulina 0 min OGTT	5,88 \pm 6,5	3,36 \pm 2,4	0,04
(Insulina 30 min – insulina 0 min)/ /(glukoza 30 min – glukoza 0 min OGTT)	28,95 \pm 28,75	20,57 \pm 34,9	> 0,05
HOMA	2,41 \pm 3,59	2,33 \pm 2,06	> 0,05
ISI (composite)	0,25 \pm 0,24	0,23 \pm 0,18	> 0,05
QUICKI	0,64 \pm 0,1	0,64 \pm 0,13	> 0,05
1/(log glukoza 0 min \times log insulina 0 min)	1,72 \pm 0,47	1,8 \pm 0,08	> 0,05
1/(insulina 0 min \times log glukoza 0 min)	0,3 \pm 0,56	0,2 \pm 0,14	> 0,05
1/(glukoza 0 min \times log insulina 0 min)	0,25 \pm 0,07	0,27 \pm 0,13	> 0,05
ISI (Cederholm)	0,44 \pm 5,9	–0,67 \pm 6,77	> 0,05
ISI (Gutt)	0,12 \pm 0,08	0,12 \pm 0,08	> 0,05

*OGTT (oral glucose tolerance test) — doustny test tolerancji glukozy; ISI (insulin sensitivity index) — współczynnik insulinowrażliwości; QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index) — współczynnik ilościowej oceny insulinowrażliwości

zygot GG. Zaobserwowano statystycznie istotną różnicę między grupami w zakresie współczynnika będącego ilorazem insulinemii w 120. minucie doustnego testu tolerancji glukozy i na czczo. U nosicieli allelu A w pozycji –308 promotora genu TNF- α średnie wartości tego współczynnika były wyższe niż u homozygot GG (5,88 \pm 6,5 vs. 3,36 \pm 2,4; p = 0,04). Porównanie pozostałych pośrednich parametrów insulinowrażliwości/insulinoooporności i sekrecji insuliny nie wykazało znamiennych różnic między grupami. Natomiast wśród nosicieli allelu A zaobserwowano zmiany niektórych opisywanych parametrów,

świadczące o nasileniu insulinoooporności, jednak nie osiągnęły one znamienności statystycznej. Dotyczyło to na przykład modelu HOMA oraz współczynnika przyrostu insuliny do glukozy w pierwszych 30 minutach OGTT. Przeprowadzono także analizę podgrup stratyfikowanych względem płci, wieku i BMI (w modelu statystycznym za każdym razem uwzględniano wpływ dwóch pozostałych zmiennych). Pozwoliło to na stwierdzenie znamiennych różnic we współczynnikach sekrecji insuliny oraz insulinoooporności w podgrupach powstałych w wyniku stratyfikacji pod względem wieku (powyżej i po-

Tabela 4. Współczynniki sekrecji insuliny oraz insulinooporności (stężenia glukozy podano w mmol/l, a stężenia insuliny w $\mu\text{J}/\text{ml}$) wśród nosicieli allelu Q oraz homozygot KK polimorfizmu K121Q genu PC-1

	Nosiciele allelu Q	Homozygoty KK	p
Insulina 0 min OGTT	10,15 \pm 4,58	11,75 \pm 12,97	> 0,05
Insulina 30 min OGTT	64,85 \pm 36,64	66,58 \pm 35,82	> 0,05
Insulina 120 min OGTT	30,89 \pm 18,18	37,01 \pm 36,2	> 0,05
Glukoza 0 min OGTT	4,53 \pm 0,9	4,49 \pm 0,67	> 0,05
Glukoza 30 min OGTT	6,68 \pm 1,56	7,19 \pm 1,93	> 0,05
Glukoza 120 min OGTT	5,18 \pm 1,37	4,98 \pm 1,35	> 0,05
Insulina 0 min/glukoza 0 min OGTT	2,23 \pm 0,9	2,6 \pm 2,63	> 0,05
Insulina 120 min/insulina 0 min OGTT (Insulina 30 min – insulina 0 min)/ /glukoza 30 min – glukoza 0 min OGTT)	3,63 \pm 3,02	4,37 \pm 4,63	> 0,05
HOMA	23,94 \pm 31,11	22,56 \pm 33,95	> 0,05
ISI (<i>composite</i>)	2,14 \pm 1,26	2,43 \pm 2,93	> 0,05
QUICKI	0,2 \pm 0,12	0,24 \pm 0,22	> 0,05
QUICKI	0,63 \pm 0,1	0,64 \pm 0,13	> 0,05
1/(log glukoza 0 min \times log insulina 0 min)	1,72 \pm 0,55	1,79 \pm 0,76	> 0,05
1/(insulina 0 min \times log glukoza 0 min)	0,19 \pm 0,1	0,25 \pm 0,38	> 0,05
1/(glukoza 0 min \times log insulina 0 min)	0,25 \pm 0,09	0,26 \pm 0,12	> 0,05
ISI (<i>Cederholm</i>)	-1,56 \pm 4,16	0,12 \pm 7,18	> 0,05
ISI (<i>Gutt</i>)	0,11 \pm 0,06	0,13 \pm 0,09	> 0,05

OGTT (*oral glucose tolerance test*) — doustny test tolerancji glukozy; ISI (*insulin sensitivity index*) — współczynnik insulinooporności;
QUICKI (*quantitative insulin sensitivity check index*) — współczynnik ilościowej oceny insulinooporności

niżej 39 lat, tj. średniej wartości w badanej populacji), występowania otyłości (BMI powyżej i poniżej 30) i występowania otyłości lub nadwagi (BMI powyżej i poniżej 25). Na przykład w podgrupie osób z otyłością lub nadwagą (BMI > 25) nosiciele allelu A w pozycji -308 G→A promotora genu TNF- α charakteryzują się znacząco wyższym ilorazem insuliny w 120. minucie OGTT i na czczo w porównaniu z nosicielami homozygot GG. W grupie osób bez otyłości (BMI < 30) u nosicieli allelu A zaobserwowano natomiast wyższe wartości glikemii na czczo i w 120. minucie OGTT, a w młodszej części grupy (osoby < 39 lat) oraz w podgrupie z otyłością lub nadwagą (BMI > 25) stwierdzono również znacząco wyższy współczynnik narastania insuliny do glikemii w pierwszych 30 minutach OGTT.

W tabeli 4 przedstawiono porównanie parametrów, charakteryzujących homozygotycznych nosicieli allelu K oraz nosicieli allelu Q (homozygot QQ oraz heterozygot KQ) w zakresie wariantu aminokwasowego K121Q w PC-1. Zaobserwowano zmiany niektórych opisywanych parametrów, wskazujące na zwiększoną insulinooporność wśród nosicieli allelu Q. Nie osiągnęły one jednak znaczącości statystycznej. Dotyczyło to wartości glikemii w 120. minucie OGTT (dla nosicieli allelu Q średnia wartość wynosiła 5,18 mmol/l, w grupie homozygot KK — 4,98 mmol/l)

oraz współczynnika przyrostu insuliny do glukozy w pierwszych 30 minutach OGTT (średnio 23,94 dla nosicieli allelu Q wobec 22,56 w grupie homozygot GG).

Także w odniesieniu do tego polimorfizmu przeprowadzono analogiczne analizy stratyfikacyjne. Niektóre ze współczynników sekrecji insuliny oraz insulinooporności wśród nosicieli allelu Q w porównaniu z homozygotycznymi nosicielami allelu K polimorfizmu K121Q genu PC-1 różniły się znacząco w powstałych podgrupach. Na przykład wśród osób nieotyłych odnotowano różnicę w zakresie glikemii w 120. minucie OGTT (nosiciele allelu Q — 5,03 mmol/l, homozygoty KK — 4,68 mmol/l, p = 0,04). Z kolei w podgrupie mężczyzn współczynnik przyrostu insuliny do glukozy w pierwszych 30 minutach OGTT różnił się znacząco (p = 0,02) u nosicieli allelu Q (38,691) w porównaniu z homozygotami KK (18,74).

Dyskusja

W niniejszym projekcie badano wpływ dwóch polimorfizmów w genach TNF- α i PC-1, których produkty są inhibitorami działania insuliny, na powstawanie fenotypu cukrzycy typu 2 oraz przedcukrzycowych cech ilościowych w populacji polskiej.

Na potencjalne znaczenie polimorfizmu -308 G→A promotora genu TNF- α w powstawaniu przedcukrzycowych cech ilościowych, oprócz opisanych na

wstępie przesłanek patofizjologicznych, wskazują także niektóre opublikowane wyniki badań genetycznych, dotyczące tego markera. Na przykład, dane z populacji hiszpańskiej [38] sugerują jego związek z obniżoną wrażliwością na insulinę, ocenianą za pomocą analizy *minimal model* [41]. W innym europejskim badaniu opisano też wpływ polimorfizmu –308 A→G genu *TNF-α* na insulinowrażliwość u dzieci osób z chorobą niedokrwienną serca [42]. Także w populacji polskiej stwierdzono wpływ badanego polimorfizmu na rozwój insulinooporności w grupie osób z rodzinną otyłością [39]. Warto jednak zwrócić uwagę, że w części badań obejmujących rasę kaukaską (m.in. w populacji duńskiej i brytyjskiej) nie znaleziono dowodów na jego znaczenie w patogenezie insulinooporności [35–37], jednak nie koncentrowano się nad analizą osób z genetycznym obciążeniem cukrzycą typu 2.

Mimo interesujących przesłanek patofizjologicznych i obiecujących wyników oceny cech ilościowych, badania osób niespokrewnionych, dotyczące samego fenotypu cukrzycy typu 2 (*case-control study*) dostarczyły niewielu pozytywnych danych. W jednym z badań udowodniono istnienie związku polimorfizmu –308 G→A promotora genu *TNF-α* z cukrzycą typu 2 w grupie osób starszych w populacji holenderskiej [43], gdzie ryzyko cukrzycy było 4,6 razy wyższe wśród homozygotycznych nosicieli allelu A niż u homozygotycznych nosicieli częstszego allelu G. Dwa inne badania przyniosły negatywne wyniki [40, 44]. W niektórych analizach wykazano natomiast zależność omawianego polimorfizmu z otyłością, będącą fenotypem związanym z cukrzycą typu 2 [27, 45, 46].

Warto jeszcze zwrócić uwagę na dane pochodzące z wielośrodkowego, fińskiego badania prospektywnego, dotyczącego zapobiegania cukrzycy typu 2 (DPS, *Finnish Diabetes Prevention Study*). W projekcie tym przeanalizowano wpływ polimorfizmu w pozycji –308 promotora genu *TNF-α* na progresję kliniczną ze stanu upośledzonej tolerancji glukozy do jawnej cukrzycy typu 2. W trakcie 3-letniej obserwacji zauważono, że nosicielstwo allelu A wiązało się z około 2-krotnie wyższą zachorowalnością na cukrzycę typu 2 [47].

Podobnie niejednoznaczne wyniki charakteryzują także badany wariant aminokwasowy K121Q genu *PC-1*. Opisano na przykład związek allelu Q z insulinoopornością u osób bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej w populacjach sycylijskiej, szwedzkiej i fińskiej [30, 48, 49], lecz wyniki te nie znalazły potwierdzenia w kilku innych badaniach [50, 51]. Nie można wykluczyć, że obserwowane rozbieżności między populacjami wynikają z tego, iż wariant Q

nie jest rzeczywistą przyczyną różnic fenotypowych, ale znajduje się w stanie nierównowagi sprzężeń (*linkage disequilibrium*) z innym polimorfizmem, którego allel lub allele prowadzą do osłabienia działania insuliny [31]. W takim przypadku zakres istniejącego w pobliżu genu *PC-1* *linkage disequilibrium* może wpływać na obserwowane różnice wyników w poszczególnych populacjach. Nie wykazano do tej pory związku polimorfizmu K121Q genu *PC-1* z samą cukrzycą typu 2 w badaniach osób niespokrewnionych (*case-control study*) [50, 52].

Populacja polska, ze względu na swoją homogenność etniczną, jest dobrym obiektem do badań genetycznych [53]. Osoby o wybranej do projektu autorów charakterystyce stanowią szczególnie interesującą grupę, w której można poddać analizie wpływ czynników genetycznych na cechy ilościowe związane z metabolizmem węglowodanów. Z jednej strony jest to niewątpliwie grupa, w której obecne są warianty genetyczne predysponujące do cukrzycy typu 2, z drugiej zaś — nie jest jeszcze obciążona wpływem glukotoksyczności na sekrecję insuliny oraz insulinowrażliwość [53]. Warto zauważyć, że krewni pierwszego stopnia chorych na cukrzycę typu 2 są obarczeni sięgającym 40% ryzykiem zachorowania na cukrzycę w ciągu całego życia [55]. Celowe jest więc poszukiwanie czynników, które mogą predysponować te osoby do rozwoju zaburzeń tolerancji glukozy, z myślą o stosowaniu środków zapobiegawczych (np. w postaci zmiany stylu życia, wprowadzenia odpowiedniej diety lub też farmakoterapii).

W kontekście przedstawionego powyżej omówienia rezultatów z innych populacji wydaje się, że wynik badania autorów, wykazujący związek analizowanych polimorfizmów w genach *TNF-1* i *PC-1* z przedcukrzycowymi cechami ilościowymi, stanowi potwierdzenie i uzupełnienie wcześniejszych doniesień. Warto w tym miejscu zauważyć, że wskaźniki, w odniesieniu do których wystąpiły różnice między nosicielami poszczególnych genotypów, są predyktorami insulinooporności, a nie wydzielania insuliny [56]. Pojawia się jednak pytanie dotyczące braku związku badanych markerów z fenotypem cukrzycy typu 2 w badaniu przeprowadzonym przez autorów, co także pozostaje w zgodzie z większością danych z literatury. Należy wziąć pod uwagę dwie możliwości. Po pierwsze, badanie to, ze względu na liczebność grup, mogło nie mieć wystarczającej siły statystycznej, aby wykazać istniejący związek. Po drugie, trzeba pamiętać, że do powstania fenotypu cukrzycy typu 2 przyczyniają się polimorfizmy w wielu różnych genach, zarówno tych wpływających na wy-

działanie insuliny, jak i na insulinooporność. Wpływ poszczególnych częstych polimorfizmów jest ograniczony i trudny do wykazania w przypadku fenotypu o tak złożonej etiologii, jakim jest cukrzyca typu 2. Bardziej realne jest wykazanie związku z cechą ilościową, którą modyfikuje mniejsza liczba czynników genetycznych. Wydaje się, że taki scenariusz miał miejsce w opisanym badaniu.

Wyniki badania pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. W populacji polskiej polimorfizmy w genach, których produkty są inhibitorami działania insuliny, substytucji -308 G→A w promotorze TNF- α i wariantu aminokwasowego K121Q w PC-1, wpływają na rozwój przedcukrzycowych cech ilościowych, przede wszystkim insulinooporności.
2. W badaniu niespokrewnionych osób chorych na cukrzycę typu 2 i osób z grupy kontrolnej (*case-control study*) nie udało się wykazać związku badanych polimorfizmów z analizowaną chorobą.

PIŚMIENNICTWO

1. Zimmet P., Alberti K.G., Shaw J.: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-787.
2. King H., Aubert R.E., Herman W.H.: Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-1431.
3. Morrish N.J., Wang S.L., Stevens L.K., Fuller J.H., Keen H.: Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 2001; 44 (supl. 2): S14-S21.
4. Selby J.V., Ray G.T., Zhang D., Colby C.J.: Excess costs of medical care for patients with diabetes in a managed care population. *Diabetes Care* 1997; 20: 1396-1402.
5. Kahn C.R.: Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 1994; 43: 1066-1082.
6. Newman B., Selby J.V., King M.C., Slemenda C., Fabsitz R., Friedman G.D.: Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 1987; 30: 763-768.
7. Warram J.H., Rich S.S., Krolewski A.: Epidemiology and genetics of diabetes mellitus. W: Kahn C.R., Weir G.C. red. *Joslin's diabetes mellitus*. Pennsylvania: Lea & Febiger, Malvern, PE, USA 1994.
8. Fajans S.S., Bell G.I., Polonsky K.S.: Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 971-980.
9. Huopio H., Otonkoski T., Vauhkonen I., Reimann F., Ashcroft F.M., Laakso M.: A new subtype of autosomal dominant diabetes attributable to a mutation in the gene for sulfonylurea receptor 1. *Lancet* 2003; 361: 301-307.
10. Ballinger S.W., Shoffner J.M., Hedaya E.V., Trounce I., Polak M.A., Koontz D.A., Wallace D.C.: Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat. Genet.* 1992; 1: 11-15.
11. McCarthy M.I.: Susceptibility gene discovery for common metabolic and endocrine traits. *J. Mol. Endocrinol.* 2002; 28: 1-17.
12. Horikawa Y., Oda N., Cox N.J., Li X., Orho-Melander M., Hara M. i wsp.: Genetic variation in the gene encoding calpain 10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 2000; 26: 163-175.
13. Altshuler D., Hirschhorn J.N., Klannemark M., Lindgren C.M., Vohl M.C., Nemesh J. i wsp.: The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 2000; 26: 76-80.
14. Baier L.J., Permana P.A., Yang X., Pratley R.E., Hanson R.L., Shen G.Q. i wsp.: A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: R69-R73.
15. Ek J., Andersen G., Urhammer S.A., Hansen L., Carstensen B., Borch-Johnsen K. i wsp.: Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant Caucasians. *Diabetologia* 2001; 44: 1170-1176.
16. Kondo H., Shimomura I., Matsukawa Y., Kumada M., Takahashi M., Matsuda M. i wsp.: Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002; 51: 2325-2328.
17. Reis A.F., Ye W.Z., Dubois-Laforgue D., Bellanne-Chantelot C., Timsit J., Velho G.: Association of a variant in exon 31 of the sulfonylurea receptor 1 (SUR1) gene with type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. *Hum. Genet.* 2000; 107: 138-144.
18. Moczulski D.K., Grzeszczak W., Gawlik B.: Role of hemochromatosis C282Y and H63D mutations in HFE gene in development of type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2001; 24: 1187-1191.
19. Huxtable S.J., Saker P.J., Haddad L., Walker M., Frayling T.M., Levy J.C. i wsp.: Analysis of parent-offspring trios provides evidence for linkage and association between the insulin gene and type 2 diabetes mediated exclusively through paternally transmitted class III variable number tandem repeat alleles. *Diabetes* 2000; 49: 126-130.
20. Boutin P., Gresh L., Cisse A., Hara M., Bell G., Babu S. i wsp.: Missense mutation Gly574Ser in the transcription factor HNF-1alpha is a marker of atypical diabetes mellitus in African-American children. *Diabetologia* 1999; 42: 380-381.
21. Urhammer S.A., Rasmussen S.K., Kaisaki P.J., Oda N., Yamagata K., Moller A.M. i wsp.: Genetic variation in the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene in Danish Caucasians with late-onset NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40: 473-475.
22. Hani E.H., Stoffers D.A., Chevre J.C., Durand E., Stanojevic V., Dina C. i wsp.: Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1999; 104: R41-R48.
23. Macfarlane W.M., Frayling T.M., Ellard S., Evans J.C., Allen L.I., Bulman M.P. i wsp.: Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 1999; 104: R33-39.
24. Cseh K., Winkler G., Melczer Z., Baranyi E.: The role of tumor necrosis factor (TNF)- α in obesity and insulin resistance. *Diabetologia* 2000; 43: 525.
25. Wilson A.G., Symons J.A., Mc Dowell T.L., McDevitt H.O., Duff G.W.: Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 3195-3199.
26. Dalziel B., Gosby A.K., Richman T.M., Bryson J.M., Caterson I.D.: Association of the TNF-alpha -308 G/A Promoter Polymorphism with Insulin Resistance in Obesity. *Obes. Res.* 2002; 10: 401-407.
27. Hoffstedt J., Eriksson P., Hellström L., Rossner S., Ryden M., Arner P.: Excessive fat accumulation is associated with the TNF α -308 G/A promoter polymorphism in women but not in men. *Diabetologia* 2000; 43: 117-120.
28. Maddux B.A., Sbraccia P., Kumakura S., Sasson S., Youngren J., Fisher A. i wsp.: Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1995; 373: 448-451.
29. Maddux B.A., Goldfine I.D.: Membrane Glycoprotein PC-1 Inhibition of Insulin Receptor Function Occurs Via Direct Interaction With the Receptor α -Subunit. *Diabetes* 2000; 49: 13-19.

30. Pizzuti A., Frittitta L., Argiolas A., Baratta R., Goldfine I.D., Bozzali M. i wsp.: A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* 1999; 48: 1881–1884.
31. Costanzo B.V., Trischitta V., Di Paola R., Spampinato D., Pizzuti A., Vigneri R. i wsp.: The Q allele variant (Gln¹²¹) of membran glycoprotein PC-1 interacts with the insulin receptor and inhibits insulin signaling more effectively than the common K allele variant (Lys¹²¹). *Diabetes* 2001; 50: 831–836.
32. Małeckı M.T., Klupa T., Wanic K., Cyganek K., Frey J., Sieradzki J.: Vitamin D binding protein gene and genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2002; 57: 99–104.
33. Małeckı M.T., Moczulski D.K., Klupa T., Wanic K., Cyganek K., Frey J., Sieradzki J.: Homozygous combination of calpain 10 gene haplotypes is associated with Type 2 Diabetes mellitus in a Polish Population. *Eur. J. Endocrinol.* 2002; 146: 695–699.
34. Report of a WHO Consultation: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Geneva 1999.
35. Rasmussen S.K., Urhammer S.A., Jensen J.N., Hansen T., Borch-Johnsen K., Pedersen O.: The –238 and –308 G→A polymorphisms do not associated with features of the insulin resistance syndrome or altered birth weight in Danish Caucasians. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85: 1731–1734.
36. Koch M., Rett K., Volk A., Maerker E., Haist K., Weissner M. i wsp.: The tumor necrosis factor alpha – 238 G→A and –308 G→A promoter polymorphisms are not associated with insulin sensitivity and insulin secretion in young healthy relatives of Type II Diabetic patients. *Diabetologia* 2000; 43: 181–184.
37. Day C.P., Groe J., Daly A.K., Stewart M.W., Avery P.J., Walker M.: Tumor necrosis factor-α gene promoter polymorphism and decreased insulin resistance. *Diabetologia* 1998; 41: 430–434.
38. Fernandez-Real J.M., Gutierrez C., Rcart W., Casamitjana R., Fernandez-Castaner M., Vendrell J. i wsp.: The TNF-α gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 1997; 46: 1468–1472.
39. Wybranska I., Malczewska-Malec M., Niedbal S., Naskalski J.W., Dembinska-Kiec A.: The TNF-alpha polymorphism at position –308 of the promoter influences insulin resistance, and increases serum triglycerides after postprandial lipaemia in familial obesity. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41: 501–510.
40. Ko G.T.C., Lee S.C., Pu Y.B., Ng M.C.Y., So W.-Y., Thomas N. i wsp.: Tumor necrosis factor — alpha promoter gene polymorphism at –308 (genotype AA) in Chinese subjects with type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* 2003; 20: 167–168.
41. Bergman R.N.: Lilly lecture 1989. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes* 1989; 38: 1512–1527.
42. Nicaud V., Raoux S., Poirier O., Cambien F., O'Reilly D.S., Tired L.: The TNF-α/G –308A polymorphism influences insulin sensitivity in offspring of patients with coronary haert disease: the European Atherosclerosis Research Study II. *Atherosclerosis* 2002; 161: 317–325.
43. Heijmans M.P., Westendorp R.G., Droog S., Klufft C., Knook D.L., Slagboom P.E.: Association of the tumor necrosis factor alpha –308G/A polymorphism with the risk of diabetes in an elderly population-based cohort. *Genes. Immun.* 2002; 4: 225–228.
44. Hamann R.L., Mantzoros C., Vidal Puig A., Flier J.S.: Genetic variability in the TNF-alpha promoter is not associated with Type II diabetes mellitus (NIDDM). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 211: 833–839.
45. Herrmann S.M., Ricard S., Nicaud V., Mallet C., Arveiler D., Evans A. i wsp.: Polymorphisms of the tumor necrosis factor-α gene, coronary heart disease and obesity. *Eur. J. Clin. Invest.* 1998; 28: 59–66.
46. Brand E., Schorr W., Kunz I., Kertmen E., Ringel J., Distler A., Sharma A.M.: Tumor necrosis factor alpha –308 G/A polymorphism in obese Caucasians. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2001; 25: 581–585.
47. Kubaszek A., Pihlajamaki J., Komarovski V., Lindi V., Lindstrom J., Eriksson J. i wsp.: Promoter polymorphism of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 2003; 52: 1872–1876.
48. Gu F.H., Almgren P., Lindholm E., Frittitta L., Pizzuti A., Trischitta V., Groop L.C.: Association between the human glycoprotein PC-1 gene and elevated glucose and insulin levels in a paired-sibling analysis. *Diabetes* 2000; 49: 1601–1603.
49. Kubaszek A., Pihlajamaeki J., Karhapaae P., Vauhkonen I., Laakso M.: The K121Q polymorphism is associated with insulin resistance but not with dyslipidemia. *Diabetes Care* 2003; 26: 464–467.
50. Rasmussen S.K., Urhammer S.A., Pizzuti A., Echwald S.M., Ekstrom C.T., Hansen L. i wsp.: The K121Q variant of the human PC-1 gene is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes among Danish Caucasians. *Diabetes* 2000; 49: 1608–1611.
51. Gonzalez-Sanchez J.L., Martinez-Larrad M.T., Fernandez-Perez C., Kubaszek A., Laakso M., Serrano-Rios M.: K121Q PC-1 gene polymorphism is not associated with insulin resistance in a Spanish population. *Obes. Res.* 2003; 11: 603–605.
52. Hegele R.A., Harris S.B., Zinman B., Hanley A.J., Cao H.: Absence of association of type 2 diabetes with CAPN 10 and PC-1 polymorphisms in Oji Cree. *Diabetes Care* 2001; 24: 1498–1499.
53. Ardile K.G., Lunetta K.L., Seielstad M.: Testing for population subdivision and association in four case-control studies. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71: 304–311.
54. Ling Z., Pipeleers D.G.: Prolonged exposure of human beta cells to elevated glucose levels reslts in sustained cellular activation leading to a loss of glucose regulation. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 2805–2812.
55. Kobberling J., Tillil H.: Empirical risk figures for first degree relatives of non-insulin- dependent diabetics. W: Kobberling J., Tattersall R. red. The genetics of diabetes mellitus. Academic Press, London 1982; 201–209.
56. Phillips D.I., Clark P.M., Hales C.N., Osmond C.: Understanding oral glucose tolerance: comparison of glucose or insulin measurements during the oral glucose tolerance test with specific measurements of insulin resistance and insulin secretion. *Diabet. Med.* 1994; 11: 286–292.